

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



**Detección y cuantificación de bacterias asociadas a
enfermedades periodontales en bacteriemias relacionadas con
manipulaciones bucales no profesionales. Estudio piloto.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TUTOR

Dra. Elena Figuero Ruiz

AUTOR

Nagore Ambrosio Elejalde

Madrid, 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la *Dra. Elena Figuera*, por sus valiosas enseñanzas, su paciencia depositada en mí y por permitirme robar parte de su tiempo; pero sobre todo por confiar en mí para hacer este trabajo. Por haberme abierto la puerta al mundo de la investigación; puerta que gratamente me ha sorprendido y espero que siga abierta e ir aprendiendo con ella en mi andadura por este nuevo camino. Muchas gracias.

También, quiero dar las gracias al equipo del *laboratorio de investigación de la UCM*, *Itziar González* y *Ana O'Connor*, así como a *María José Marín* y *María Sánchez*, por la ayuda que me han brindado y todo los conocimientos básicos que me han facilitado para trabajar en el laboratorio.

No puedo olvidarme de dar las gracias a *Rosa María Simón*, ya que sin ella la toma de muestras no hubiera sido posible.

También quiero agradecer la ayuda que me han dado los *alumnos del Máster de Periodoncia de la UCM*, especialmente a *Estefanía*, que sin ella la recolección de pacientes no hubiera sido lo mismo.

Por último, quiero agradecer a todos los *pacientes* que de una manera voluntaria han participado en este trabajo, sin ellos nada de esto habría sido posible.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	5
II.	HIPÓTESIS	13
III.	OBJETIVOS.....	14
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	15
V.	RESULTADOS	24
VI.	DISCUSIÓN.....	32
VII.	CONCLUSIONES	40
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	41
IX.	ANEXOS	47

I. **INTRODUCCIÓN**

1. ENFERMEDADES PERIODONTALES

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades de naturaleza infecciosa e inflamatoria. Según la clasificación de enfermedades y condiciones periodontales del *International Workshop* de 1999, dentro del amplio grupo de estas enfermedades (Armitage 1999) se encuentran las enfermedades gingivales y las periodontitis. Las enfermedades gingivales o gingivitis son una reacción inflamatoria reversible de los tejidos periodontales. Por otro lado, las periodontitis se caracterizan por una reacción inflamatoria crónica con destrucción del aparato de soporte del diente (periodonto).

La prevalencia de las periodontitis es muy elevada en los países desarrollados. Según la Encuesta Nacional de Salud en España de 2012, cerca del 40% de las personas entre 65-74 años tendría lesiones evidentes de periodontitis, y en el grupo etario entre 35-44 años la proporción sería del 28%. Además, 8 de cada 10 personas mayores de 35 años sufrirían algún tipo de enfermedad periodontal (ENSE 2011/12).

El factor etiológico primario de este tipo de enfermedades es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de biofilm subgingival. La microflora responsable de estas enfermedades es compleja, debido a que se han detectado más de 700 especies bacterianas diferentes en el biofilm subgingival. En los últimos años, los estudios clínicos han definido patógenos clave con clara importancia etiológica en la iniciación y progresión de la periodontitis (AAP 1996) y se ha demostrado que la presencia de ciertas bacterias o asociaciones bacterianas son un factor de riesgo para futura pérdida de inserción periodontal.

Estas bacterias se clasifican en tres grandes grupos según la fuerza de asociación con la periodontitis. En el primer grupo se encuentran bacterias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*, teniendo estas una fuerte evidencia en la etiología y progresión de las

periodontitis. De hecho, estudios recientes han demostrado que la frecuencia de detección de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis es especialmente elevada en España (superior al 60%). Por otro lado, *A. actinomycetemcomitans*, aunque con una baja prevalencia en la población española (Sanz et al. 2000), presenta un elevado potencial patógeno debido a sus factores de virulencia. (Claessonn et al. 2011; Haubek et al. 2008).

En un segundo grupo con una moderada asociación con la periodontitis, se engloban las bacterias *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micras* y *Treponema denticola*.

Por último en el tercer grupo se encuentran bacterias como *Eikenella corrodens*, teniendo ésta una evidencia inicial en la etiología de estas enfermedades. (AAP 1996).

Aunque la acumulación bacteriana y la organización en el biofilm es el iniciador de la enfermedad periodontal, la respuesta inmunitaria desencadenada en el huésped es la responsable de la destrucción de los tejidos periodontales. Células del sistema inmune, como los leucocitos activados a nivel gingival, son responsables de la generación de cantidades desproporcionadas de mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas (Interleuquina 1, 6, 8 y factor tumoral de necrosis alfa), prostaglandinas y metaloproteinasas, promoviendo la destrucción de tejido blando y duro. A esta interacción compleja entre la infección bacteriana y la respuesta del sistema inmune del hospedador se le suma la influencia de factores de riesgo genéticos y adquiridos, considerándose por ello la periodontitis una enfermedad multifactorial (Sanz et al. 2010; Page et al. 1997; Page & Korman 1997).

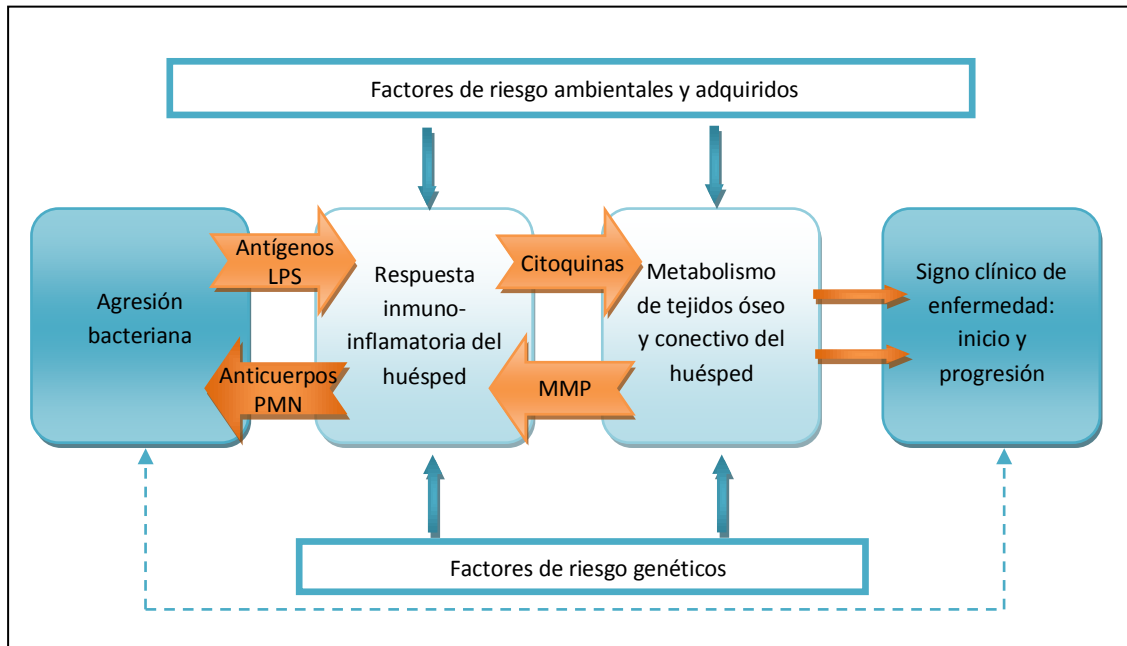


Figura 1. Modelo de la patología multifactorial de las enfermedades periodontales. (Adaptado de Kormman et al. 2008). PMN: leucocitos polimorfonucleares; LPS: lipopolisacáridos bacterianos; MMP: metaloproteinasas.

Una de las principales consecuencias de las periodontitis, la pérdida de dientes, causa una importante morbilidad en los pacientes, asociada a dificultades funcionales y estéticas; sin embargo, en los últimos años las periodontitis también se han asociado con problemas de salud sistémico.

2. MEDICINA PERIODONTAL

El término “Medicina Periodontal” nació de la mano de Steven Offenbacher en 1996. Esta rama de la periodoncia tiene como objetivo, estudiar y establecer una posible relación entre las enfermedades periodontales y las enfermedades o afecciones sistémicas, así como evaluar su plausibilidad biológica y sus implicaciones preventivas y terapéuticas. (Offenbacher et al. 1996)

La perspectiva de que la boca era una estructura aislada del resto del organismo empezó a cambiar en 1989, gracias al trabajo publicado por científicos finlandeses en el que se concluyó que las infecciones de origen odontológico se asociaban positivamente con el desarrollo del infarto agudo de miocardio y con el infarto cerebral (Mattila et al. 1989).

Desde entonces numerosos estudios han sido publicados analizando la periodontitis en unión a enfermedades o estados sistémicos como la diabetes, el embarazo o ciertas enfermedades cardiovasculares, entre otras.

En el caso de la diabetes, se sabe que existe una relación bidireccional entre ambas entidades clínicas. Investigaciones recientes han mostrado que la diabetes puede aumentar el riesgo de sufrir periodontitis y así mismo, ha sido propuesto que la periodontitis crónica puede influir en el curso natural de la diabetes (Bascones et al. 2012). Además, existe evidencia consistente y robusta de que la periodontitis, afecta negativamente a los niveles de glucosa en sangre expresados como hemoglobina glicosilada (HbA1c) en personas con y sin diabetes, asociándose por ella con un mayor riesgo de desarrollar diabetes (Chaple et al. 2013)

En cuanto al embarazo, son muchos los estudios que relacionan la periodontitis con posibles efectos adversos del embarazo como el parto prematuro, la preeclampsia o el bajo peso al nacer (Sanz et al. 2013). Sin embargo, sigue existiendo mucha controversia y la fuerza de las asociaciones observadas basada en parámetros clínicos es modesta y parece variar en función de la población estudiada (Ide et al. 2013).

Respecto al grupo de las enfermedades cardiovasculares, en la mayoría de estudios llevados a cabo han encontrado una asociación positiva entre ambas enfermedades (Beck et al. 2000; Bouchard et al. 2010; Friedewald et al. 2009), existiendo evidencia epidemiológica consistente y fuerte de que las periodontitis confieren un mayor riesgo para futuros accidentes cardiovasculares (Tonetti et al. 2013). Aunque los hallazgos derivados de estos estudios clínicos epidemiológicos apuntan a la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la periodontitis y las enfermedades cardiovasculares, lo que todavía queda por probar es

si estas asociaciones son causales, existiendo una posible relación causa-efecto entre el factor de riesgo (periodontitis) y el efecto (enfermedad cardiovascular), siendo por ello un factor independiente para el inicio o progresión de enfermedades cardiovasculares (Castro et al. 2001; Sanz et al. 2010).

Muchos investigadores se han preguntado que fundamento biológico podría explicar el posible vínculo entre la enfermedad periodontal y estas afecciones sistémicas. Por ese motivo, han sido propuestos diferentes mecanismos biológicos que pueden explicar el nexo de unión entre ambas entidades clínicas.

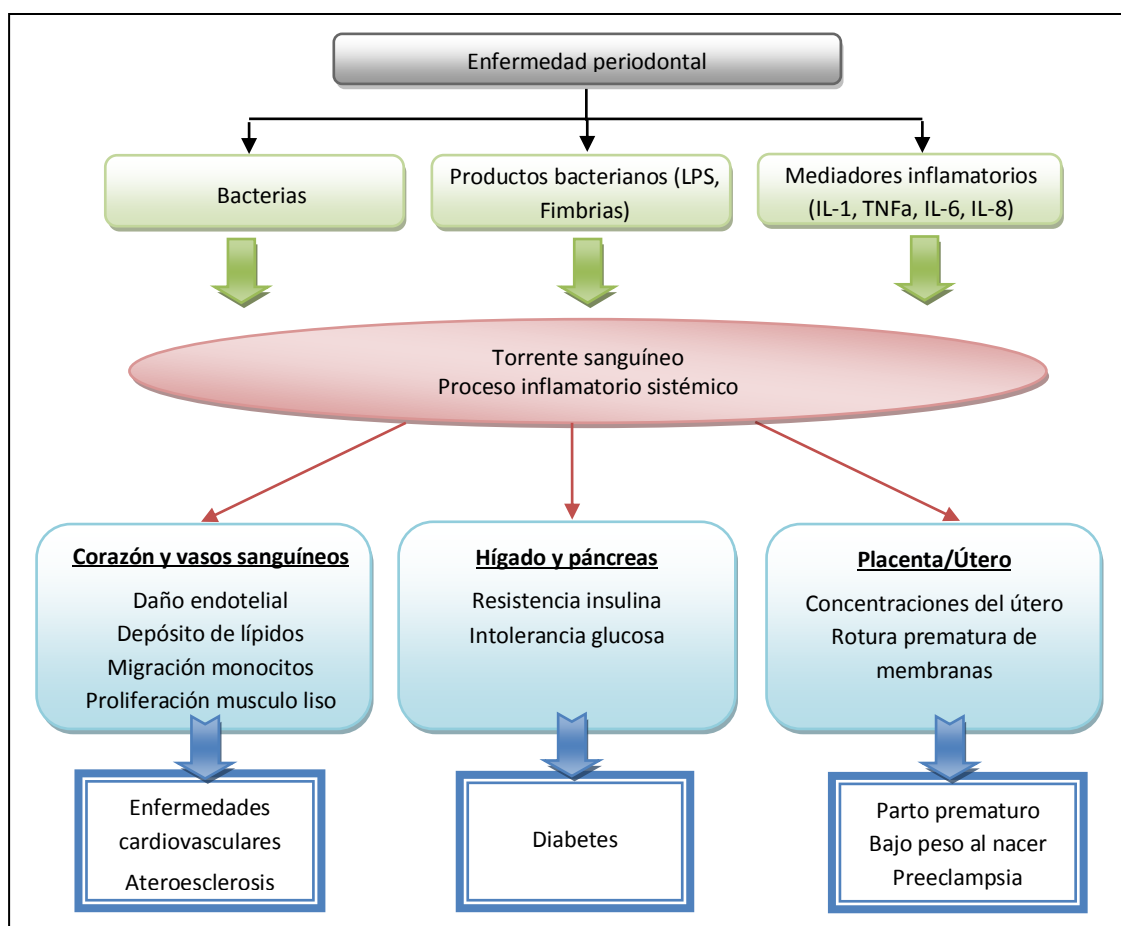


Figura 2. Enfermedad periodontal y afecciones sistémicas – relación y posibles mecanismos patogénicos. (Adaptado de Anil S, Al.ghamdi H 2005) (LPS: lipopolisacárido; IL-1: interleuquina 1; IL-6: interleuquina 6; IL-8: interleuquina 8; TNFα: tumor de necrosis alfa).

Por un lado, las bacterias periodontopatógenas o alguno de sus componentes antigénicos presentes a nivel subgingival (por ejemplo el lipopolisacárido o endotoxinas) inducen una respuesta inmuno-inflamatoria con liberación de citoquinas en el paciente (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , PG-E2 y diferentes metaloproteinasas). Estos mediadores pueden diseminarse sistémicamente e influir a distancia, bien sea por una acción directa sobre la pared vascular, la activación de los monocitos y la hipercoagulabilidad, influyendo por ejemplo en la etiología de la aterosclerosis. También pueden actuar indirectamente mediante la activación del hígado y la liberación de proteínas de fase aguda, tales como la proteína C-reactiva (CRP), que desarrollan un estado de inflamación sistémico crónico (Chun et al. 2005).

Por otro lado, otra de las explicaciones que pueden justificar la plausibilidad biológica de las asociaciones que se están encontrando, es que las bacterias periodontopatógenas, pueden pasar directamente a la circulación sanguínea sistémica, dando lugar a bacteriemias de origen oral. Esta vía directa supone el objetivo del presente estudio.

3. LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES Y LA BACTERIEMIA

La bacteriemia de origen oral, es definida como la presencia de bacterias orales procedentes del biofilm subgingival en el torrente sanguíneo (Carmona et al. 2002).

Una de las características particulares que presenta el biofilm subgingival, es su proximidad a tejidos muy vascularizados. Se sabe por ello, que la diseminación de las bacterias al torrente sanguíneo es a través del epitelio de unión ulcerado de la lesión periodontal. Por este motivo, cualquier alteración de la integridad física del epitelio subgingival, que es a los sumo aproximadamente 10 capas de células de espesor, podría dar lugar al paso de bacterias periodontopatógenas al sistema vascular (Parahitiyawa et al. 2009; Reyes et al. 2013).

Aunque la mayoría de las bacteriemias son de corta duración, desde hace tiempo se ha reconocido la posibilidad de que las bacterias periodontopatógenas pueden causar infecciones locales a distancia (Ford et al. 2006).

Varios estudios han demostrado la presencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en placas ateroscleróticas, aneurismas de la aorta abdominal y válvulas cardíacas (Nakano et al. 2009; Zaremba et al. 2007; Gaetti-Jardim et al. 2009; Figuero et al. 2011), así como en tejidos placentarios y líquido amniótico en embarazadas (León et al. 2007). Además, estudios *in vitro* han demostrado que las bacteriemias recurrentes de *P. gingivalis* inducen lesiones aórticas y coronarias de aterosclerosis en cerdos normocolesterolémicos (Brodala et al. 2005).

La ocurrencia de bacteriemias de origen oral ha sido publicada en distintos estudios clínicos tras la realización de distintos procedimientos preventivos y terapéuticos bucales, como raspado periodontal, extracción dentaria, cirugía o sondaje periodontal (Castillo et al. 2011; Kinane et al. 2005; Forner et al. 2006; Daly et al. 2001; Morozumi et al. 2010)

No obstante, estudios recientes también han resaltado la presencia de bacterias periodontales en el torrente sanguíneo tras actividades diarias rutinarias como la masticación (Forner et al. 2006; Fine et al. 2010), el cepillado de dientes (Hartzell et al. 2005) y el uso de seda dental (Crasta et al. 2009) en pacientes con periodontitis.

A diferencia de las manipulaciones profesionales, este tipo de situaciones y actividades de la vida cotidiana, pueden llevar a un efecto acumulativo crónico a pequeñas cantidades de bacterias periodontales en el sistema vascular y no ser un hecho aislado y puntual, como ocurre en los procedimientos clínicos. (Reyes et al. 2013). De hecho, autores como Guntheroth (1984) (Guntheroth 1984) estiman una exposición colectiva de 5.370 minutos de bacteriemia, en un mes, como resultado de las actividades cotidianas orales, en comparación con sólo 6 minutos de la bacteriemia asociada a la extracción de un diente. A su vez, existen autores que han estimado que el riesgo acumulativo de cepillarse los dientes dos veces por día tiene 154,2 veces mayor riesgo que con una extracción dental (Roberts 1999).

A pesar de que existen estudios analizando este tipo de bacteriemias de carácter constante, sus resultados son muy desiguales, mostrando prevalencias de bacteriemias tan dispares como un 15% o un 90% (Kinane et al. 2005; Forner et al. 2006; Morozumi et al. 2010). Esto puede deberse: (1) a las diferencias en las características de los grupos de estudio respecto al estado de salud oral del paciente; (2) a que la magnitud o estímulo utilizado para el procedimiento oral para inducir la bacteriemia no haya sido suficiente.; o (3) a las técnicas de análisis utilizadas, ya que, en la mayoría de los trabajos, la identificación de los aislamientos bacterianos se efectuó mediante el empleo de técnicas microbiológicas convencionales, no utilizando medios específicos para bacterias periodontopatógenas.

Por ello, resulta de interés la aplicación de los conocimientos de los que disponemos en la actualidad en microbiología oral en cuanto a técnicas de cultivo de periodontopatógenos, para el análisis de bacteriemias en sujetos con diagnósticos periodontales bien definidos y empleando un estímulo para la inducción de bacteriemia fácil de probar, tal y como es el uso de cepillos interproximales por parte del profesional.

II. HIPÓTESIS

En pacientes con periodontitis en comparación con pacientes con salud periodontal, existe un riesgo aumentado de sufrir bacteriemias repetidas, especialmente tras el uso de cepillos a nivel interproximal, que pueden ser detectadas mediante las técnicas microbiológicas de cultivo utilizadas para detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de fluido crevicular.

III. OBJETIVOS

Objetivo 1: Comparar la prevalencia y los niveles de especies bacterianas asociadas con enfermedades periodontales mediante técnicas de cultivo en muestras de sangre antes y después del uso de cepillos interproximales, en pacientes sanos y con periodontitis.

Objetivo 2: Determinar la influencia de los niveles de especies bacterianas asociadas con enfermedades periodontales a nivel subgingival en la presencia de bacteriemias tras el uso de cepillos interproximales.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio transversal piloto, que fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínico Universitario de San Carlos.

Se seleccionaron de forma consecutiva 11 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica generalizada moderada-avanzada que no hubieran recibido tratamiento periodontal previo y 11 pacientes periodontalmente sanos, que acudieron a la Clínica del Posgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid) de acuerdo a los criterios de inclusión/exclusión especificados.

Criterios de inclusión

1. Mayores de 30 años.
2. Presencia de al menos, 3 dientes por cuadrante.
3. Grupo con periodontitis: profundidades de sondaje superiores a 5mm y pérdida ósea marginal superior al 30% en, al menos, el 50% de los dientes) (Tonetti et al. 2007).
4. Grupo periodontalmente sano: sangrado al sondaje inferior al 25% sin pérdida de inserción.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que hubieran recibido tratamiento periodontal en el último año.
2. Toma de antibióticos en los 3 meses previos al estudio.
3. Fumadores de 10 o más cigarrillos al día.
4. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
5. Enfermedades crónicas como la diabetes, que puedan afectar a la periodontitis.
6. Enfermedades periodontales necrosantes.
7. Infección por VIH.
8. Ingesta crónica de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

1. VISITAS DEL ESTUDIO

a. Visita de selección

Se realizó una exploración periodontal completa para determinar si el paciente cumplía los criterios de inclusión/exclusión señalados. Aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión, recibieron información sobre el objetivo del estudio (*Anexo I*) y se les invitó a participar mediante la firma de un consentimiento informado (*Anexo II*).

Todas las variables clínicas fueron registradas mediante la sonda periodontal CPC-12 (Hu-Friedy Europa, Rotterdam, Holanda) por un único entrenado calibrado en seis localizaciones por diente. Las variables clínicas registradas fueron:

- Profundidad de sondaje (PS) y recesión (REC) en milímetros. El nivel de inserción clínica (NIC) se calculó mediante la suma de la profundidad de sondaje y la recesión.
- Índice de placa (IP), detectable visualmente o con sonda periodontal como presente/ausente.
- Sangrado al sondaje (BOP), detectado como presente/ausente 30 segundos después del sondaje.
- Número de dientes presentes.

Además se determinó el grado de pérdida ósea (<30%, 30-50%, >50%) mediante radiografía panorámica que todos los pacientes que acudieron a tratamiento a la Facultad de Odontología reciben.

Estos datos se emplearon para establecer el diagnóstico periodontal de cada sujeto.

b. Visita para toma de muestras

Se realizó, al menos, una semana después de la visita de selección. Ese día se pidió a los pacientes que no realizaran ningún procedimiento de higiene bucodental (incluido el cepillado) antes de la cita y que ingirieran sólo alimentos líquidos durante la comida previa a la cita.

La toma de muestra de sangre se realizó antes (basal) y un minuto después de haber finalizado el procedimiento de higiene bucal interproximal, consistente en el paso de los cepillos interdentes (Interprox®, Dentaïd, Cerdanyola, España) más gruesos para cada espacio interproximal en todos los espacios interproximales existentes distales al canino durante un tiempo total de 2 minutos, por parte de un único investigador entrenado, en todos los casos.

2. TOMA DE MUESTRAS***a. Muestras de sangre***

Todos los procedimientos se realizaron en el quirófano de implantes de la Clínica del Posgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Se tomó una vía en la vena antecubital que permitió la toma repetida de muestras de sangre periférica mediante técnica convencional (Vacutainer™, Becton Dickinson, San Agustín de Guadalix, Madrid, España). Estos procedimientos fueron realizados por una enfermera según las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Loza Fernández et al. 2003). Se tomaron dos muestras de sangre de 2 ml, una de ellas antes de iniciar los procedimientos de higiene oral interproximal y otra un minuto después. Ambas muestras fueron recogidas en viales con EDTA (BD Vacutainer, K3E 3.6 mg, San Agustín de Guadalix, Madrid, España)



Figura 3. Material para extracción de sangre

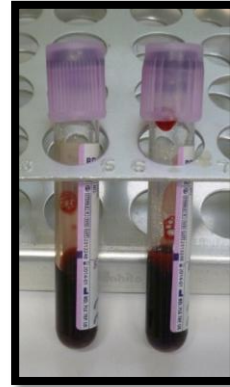


Figura 4. Muestra de 2 ml basal y 2 ml post procedimientos de higiene oral.

b. Muestras de fluido crevicular gingival (FCG)

En los pacientes con periodontitis se seleccionó la localización más accesible con la mayor profundidad de sondaje y sangrado al sondaje de cada cuadrante (Mombelli et al. 1991). En los pacientes sanos, se seleccionó la localización más accesible con sangrado al sondaje de cada cuadrante, y en caso de no haber sangrado, en mesiovestibular de los primeros molares.

Tras la eliminación cuidadosa de los depósitos de placa supragingival, se aislaron las zonas de interés mediante rollos de algodón y secado con aire. Se introdujeron dos puntas de papel estériles (tamaño medio, Maillefer, Ballaigues, Suiza) de forma consecutiva en la profundidad de la bolsa o del surco periodontal y se dejaron en esa posición durante 10 segundos. Las puntas de papel de las cuatro localizaciones seleccionadas se introdujeron en un único vial con 2 ml de fluido de transporte reducido (RTF) (Sanz et al. 2000).

La toma de muestras de FCG se realizó a los 10 minutos de haber tomado las muestras de sangre.



Figura 5. Material para toma muestras FCG

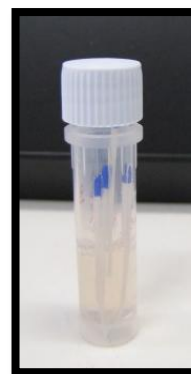


Figura 6. Muestras FCG.
Vial RTF.

3. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Cada una de las muestras se analizó mediante técnicas de cultivo, en las 2 horas siguientes a su toma.

a. Procesado de las muestras de FCG.

Se vortió el vial dónde se encontraban las puntas de papel durante 30 segundos y se prepararon diluciones seriadas 1:10 en PBS (phosphate-buffered saline). De cada dilución se plaquearon 100 μ l en medio agar no selectivo (Oxoid no 2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementado con sangre de caballo al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l) para la determinación del recuento total de anaerobios y para la identificación de los patógenos bacterianos específicos.

Para el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, las muestras también se plaquearon en placas de medio Dentaïd-1 (Alsina et al. 2001).

Las placas de agar sangre fueron examinadas tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ at 37°C). Las placas Dentaïd-1 fueron examinadas entre 3 y 5 días de incubación a 37°C en aire con 5% de CO₂.

Los recuentos totales de anaerobios se realizaron en las placas de agar. La presencia y la cantidad de los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus* y *Fusobacterium nucleatum*, además de cualquier otra especie que creció de manera relevante en el medio, se realizó en las placas de agar no-selectivo. La identificación de las especies bacterianas seleccionadas se basó en la tinción Gram y en la morfología celular, aerotolerancia, producción de catalasa y se confirmó mediante el empleo de test bioquímicos estándar (RapID™ ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

Se recontaron las colonias en la placa con la dilución más adecuada, aquella con entre 30 y 300 colonias, y se calculó el porcentaje que suponía cada patógeno respecto a la flora total.

Los recuentos totales de *A. actinomycetemcomitans* se realizaron en las placas de Dentaaid-1. La identificación se basó en la típica morfología de su colonia (estructura interna de estrella), su reacción catalasa positiva y al uso de una serie de enzimas específicos (RapID™ NH System, Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

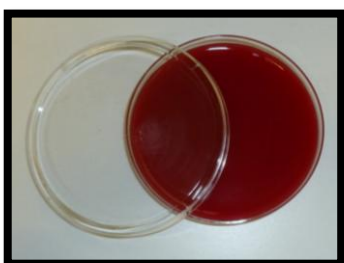


Figura 7. Placa agar sangre no –selectivo.

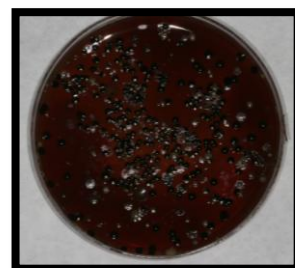


Figura 10. Placa agar sangre no –selectivo tras periodo de incubación; para recuento.

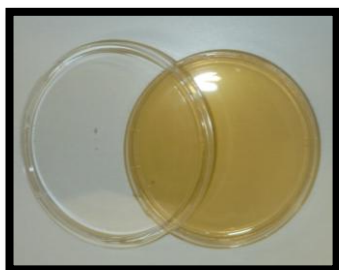


Figura 8. Placa Dentaaid-1.



Figura 9. Jarra de anaerobiosis para incubar las placas.

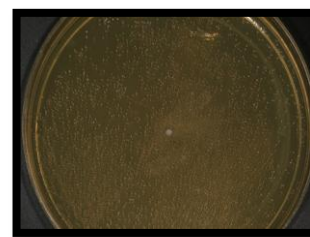


Figura 11. Placa Dentaaid-1 tras periodo de incubación; para recuento.

b. Procesado de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre para cultivo se analizaron de forma inmediata tras su recogida.

Las muestras recibieron los siguientes procedimientos:

- 100µl de sangre fueron plaqueados directamente en placas de agar sangre no selectivas por duplicado y en placas Dentaïd-1 por duplicado.
- Se prepararon diluciones seriadas (1:10) en PBS y se plaquearon tanto en placas de agar como en placas Dentaïd-1.

El resto del procedimiento y el modo de recuentos fue el mismo que el descrito para las muestras de FCG.

4. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Unidad de análisis: el paciente

Variables objeto de estudio:

Como variables clínicas se analizaron *edad, sexo, PS, REC, BOP, IP*. La PS y el BOP se analizaron tanto en toda la boca como en aquellas localizaciones en las que se habían tomado las muestras para FCG.

Como variables microbiológicas, tanto para las muestras de FCG como para las muestras de sangre, estas fueron las variables analizadas:

- *Recuento total de patógenos*: el total de patógenos anaerobios presentes en las muestras fue calculado a partir de los recuentos totales presentes en las placas agar sangre y Dentaïd-1, multiplicados por el factor de dilución. Estos resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

- *Recuento individual de cada patógeno*: fue calculado a partir de los recuentos individuales de los patógenos presentes en las placas agar sangre y Dentaïd-1, multiplicándolo por el factor de dilución. Los resultados se reflejaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).
- *Porcentaje de cada patógeno*: tras la identificación y recuento de los patógenos periodontales, también fue calculada la proporción que representaba cada una de ellos respecto al recuento total de la flora anaerobia, expresándose con porcentajes (%).
- *Prevalencia de cada patógeno*: se analizaron de manera dicotómica como presencia o ausencia de cada patógeno.

Los datos de las variables cuantitativas (recuentos y porcentajes) se presentaron en forma de media y desviación estándar (DE). Los datos de las variables categóricas (prevalencia), se presentaron como porcentajes de sujetos positivos para cada uno de los patógenos.

Se consideró como **variable respuesta principal**: la prevalencia de bacterias en muestras de sangre tras el procedimiento de higiene oral interproximal.

Así mismo, se consideraron las siguientes **variables respuestas secundarias**:

- Presencia y niveles de bacterias periodontales en FCG.
- Presencia y niveles de bacterias periodontales en muestras de sangre en basal.
- *PS, REC, BOP, IP* global.
- *PS, REC, BOP, IP* específica de las localizaciones registradas para la toma de muestras FCG.

Distribución de datos

Para el análisis de la distribución de la muestra se observaron la tendencia central, la dispersión y la asimetría de la misma mediante la representación grafica de los datos.

Así mismo se realizó el test de Shapiro-Wilk para observar si los datos se distribuían según la norma.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics 19.0.

Todos los test estadísticos se efectuaron a dos colas y la significación estadística se estableció con $p < 0,05$ (no hemos dado intervalos de confianza, cuidado).

En función de la normalidad de las distribuciones, se utilizaron los test U de Mann-Whitney o t-student para comparación de medias de variables cuantitativas y los test Fisher'sExact o Chi-cuadrado para las variables categóricas.

V. RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Las variables clínicas registradas en los pacientes se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1):

	PERIODONTALMENTE SANOS Media (DE)	PERIODONTITIS CRÓNICA Media (DE)	Valor p
Nº sujetos	11	11	
Sexo	V: 3 M: 8	V: 2 M: 9	>0,05
Edad	42,5 (11,75)	50,31 (7,6)	0.08
IP global (%)	19,89 (16,20)	75,88 (29,17)	0,001
PS global (mm)	1,83(0,28)	3,79(0,720)	<0,001
BOP global (%)	9,43 (4,49)	63,47 (29,56)	<0,001
REC global (mm)	0,04 (0,06)	0,96 (0,79)	<0,001

Tabla 1. Variables clínicas. (BOP: sangrado al sondaje; DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; REC: recesión; V; varón; M: mujer).

Las diferencias significativas aparecen marcadas en negrita.

Los valores de índice de placa, profundidad de sondaje, sangrado al sondaje y recesión medios fueron superiores en el grupo de pacientes diagnosticados con periodontitis crónica, en comparación con el grupo de sujetos periodontalmente sanos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Los valores clínicos de las localizaciones registradas para la toma de muestras FCG aparecen reflejados en la tabla 2.

	PERIODONTALMENTE SANOS Media (DE)	PERIODONTITIS CRÓNICA Media (DE)	Valor p
IP (%)	11,36 % (30,33%)	88,64 % (17,18%)	<0,001
PS (mm)	2,55 (0,75)	6,07 (1,32)	<0,001
BOP (%)	15,91 % (16,85%)	95,45 % (10,11%)	<0,001
REC (mm)	0,09 (0,17)	0,61 (0,74)	0,083

Tabla 2. Valores clínicos de localizaciones muestras FCG. (BOP: sangrado al sondaje; DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; REC: recesión).

Las diferencias significativas aparecen marcadas en negrita.

Podemos observar que para las variables de índice de placa, profundidad de sondaje, y sangrado al sondaje existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo superiores en el grupo de pacientes diagnosticados con periodontitis crónica. Destaca sobre todo los valores de la variable profundidad de sondaje, siendo la media para el grupo de periodontitis crónica de 6,07 mm (DE=1,32) a diferencia del grupo periodontalmente sano donde la media es de 2,54 mm (DE=0,75).

2. FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL (FCG)

Los resultados respecto al recuento total e individual de cada patógeno se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3):

RECuentos (UFC/ml)	PERIODONTALMENTE	PERIODONTITIS	Valor <i>p</i>
	SANOS Media(DE)	CRÓNICA Media (DE)	
Flora bacteriana total	4,03E5 (3,64E5)	1,19E7 (1,02E7)	0,004
<i>Aa</i>	1,93E3 (6,39E3)	6,76E4 (1,86E5)	0,223
<i>Pg</i>	5,00E3 (8,14E3)	5,70E6 (6,52E6)	0,002
<i>Pi</i>	6,18E3 (1,19E4)	5,95E5 (8,25E5)	0,001
<i>Tf</i>	9,09E2 (1,81E3)	7,36E5 (1,20E6)	<0,001
<i>Pm</i>	1,00E3 (3,32E3)	3,73E4 (1,20E5)	0,306
<i>Cr</i>	2,27E3 (7,54E3)	0,00E0 (0,00E0)	0,317
<i>Fn</i>	2,30E4 (2,66E4)	2,65E5 (4,36E5)	0,003
<i>Capn</i>	9,09E1(3,02E2)	2,73E4 (6,46E4)	0,375
<i>Ec</i>	1,81E3 (4,05E3)	9,09E2 (3,02E3)	0,621

Tabla 3. Recuento total e individual de cada patógeno. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *DE*: desviación estándar; *Ec*: *Eikenella corrodans*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *M*: media; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pm*: *Parvimonas micra*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; UFC/ml: unidad formadora de colonia/mililitro).

Las diferencias significativas aparecen marcadas en negrita.

En los pacientes con periodontitis se observó un mayor **recuento total de bacterias** anaerobias existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.004$) respecto al grupo de pacientes periodontalmente sanos.

En cuanto al **recuento individual de cada bacteria** (UFC/ml) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al recuento individual de *P.gingivalis* ($p=0,002$), *P.intermedia* ($p=0,001$), *T.forsythia* ($p<0,001$) y *F.nucleatum* ($p=0,003$) siendo más abundantes en pacientes con periodontitis. La bacteria con mayor recuento en el grupo de periodontitis fue *P.gingivalis* frente a *F. nucleatum* en el grupo de pacientes periodontalmente sanos. (Figura 12).

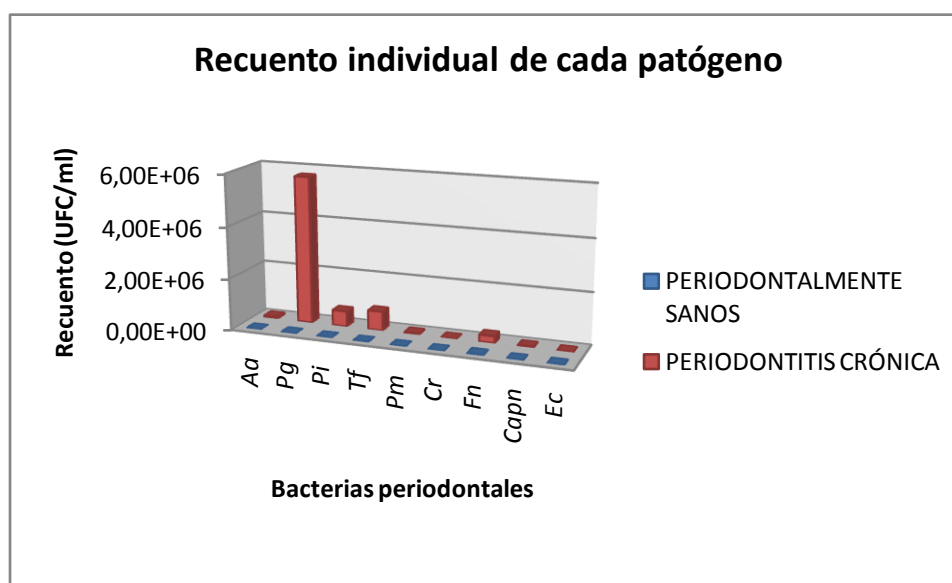


Figura 12. Recuento individual de cada patógeno. (Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Capn: *Capnocytophaga*; Cr: *Campylobacter rectus*; Ec: *Eikenella corrodans*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Pi: *Prevotella intermedia*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pm: *Parvimonas micra*; Tf: *Tannerella forsythia*).

En cuanto a los resultados de **porcentaje de cada bacteria** respecto al recuento total, podemos analizarlos de forma resumida en la siguiente tabla: (Tabla. 4)

Porcentajes (%)	PERIODONTALMENTE	PERIODONTITIS	Valor <i>p</i>
	SANOS Media(DE)	CRÓNICA Media (DE)	
<i>Aa</i>	0,05 % (0,43%)	1,01 % (4,32%)	0,500
<i>Pg</i>	0,03% (1,01%)	1,39 % (3,787%)	0,306
<i>Pi</i>	1,77% (3,12%)	38,69% (26,49%)	0,002
<i>Tf</i>	4,61% (9,07%)	5,59% (5,62%)	0,069
<i>Pm</i>	0,46% (1,00%)	9,03% (8,64 %)	0,001
<i>Cr</i>	0,98% (3,25%)	0,42% (1,38%)	0,354
<i>Fn</i>	2,23% (7,39%)	0,00% (0,00%)	0,317
<i>Capn</i>	6,56% (7,711)	3,03% (3,128)	0,375
<i>Ec</i>	0,08% (0,27%)	0,09% (0,20%)	0,621

Tabla 4. Porcentaje de cada bacteria. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *DE*: desviación estándar; *Ec*: *Eikenella corrodans*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *M*: media; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pm*: *Parvimonas micra*; *Tf*: *Tannerella forsythia*).

Las diferencias significativas aparecen marcadas en negrita.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de bacterias como *P.micras* ($p=0,002$) y *P.intermedia* ($p=0,001$), siendo los valores medios de estas bacterias mayores en el grupo de pacientes con periodontitis crónica.

En relación a los resultados de la **prevalencia de cada bacteria** (porcentaje de sujetos positivos para cada bacteria) podemos analizarlos en la siguiente tabla: (Tabla 5)

Prevalencia	PERIODONTALMENTE	PERIODONTITIS	Valor p
	SANOS %	CRÓNICA %	
<i>Aa</i>	9,1	27,3	0,586
<i>Pg</i>	26,4	81,4	0,004
<i>Pi</i>	36,4	90,9	0,012
<i>Tf</i>	27,3	90,9	0,004
<i>Pm</i>	9,1	27,3	0,293
<i>Cr</i>	9,1	0	0,500
<i>Fn</i>	90,9	100	0,500
<i>Capn</i>	9,1	18,2	0,500
<i>Ec</i>	18,2	9,1	0,500

Tabla 5. Prevalencia de cada patógeno. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *Ec*: *Eikenella corrodans*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pm*: *Parvimonas micra*; *Tf*: *Tannerella forsythia*).

Las diferencias significativas aparecen marcadas en negrita.

En cuanto a la prevalencia (presencia/ausencia) de cada patógeno, que fue indicada como porcentaje de pacientes positivos a cada bacteria, (Fig. 13), se vieron diferencias estadísticamente significativas en las bacterias *P. gingivalis* ($P=0,004$) y *T.Forsythia* ($p=0,004$), observando que existía una mayor prevalencia de las mismas en el grupo de sujetos con periodontitis crónica.

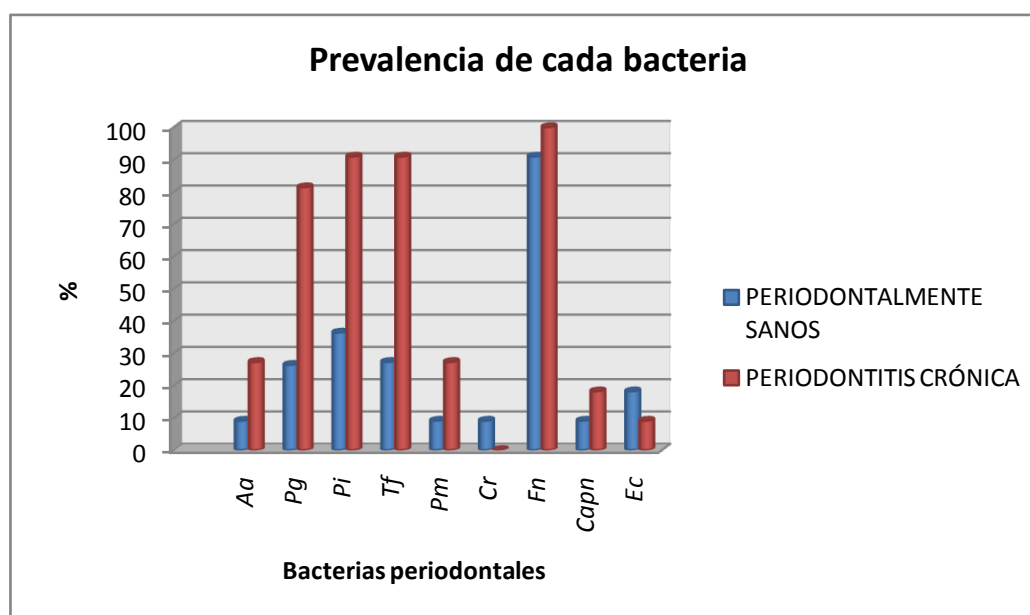


Figura 13. Prevalencia de cada patógeno. (Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Capn: *Capnocytophaga*; Cr: *Campylobacter rectus*; Ec: *Eikenella corrodans*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Pi: *Prevotella intermedia*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pm: *Parvimonas micra*; Tf: *Tannerella forsythia*).

3. MUESTRAS DE SANGRE

Del total de los 22 pacientes del estudio, 4 de ellos presentaron **bacteriemia basal**, uno perteneciente al grupo de sanos y tres al grupo de periodontitis ($p=0,070$). En uno de los casos, correspondiente a un paciente con periodontitis, se identificó *F.nucleatum*. En los demás casos, las bacterias aisladas predominantemente fueron bacterias blanco-pigmentadas no hemolíticas, no identificables con ninguna de las especies bacterianas relacionadas con enfermedades periodontales.

Tras los procedimientos de cepillado interproximal, se observó bacteriemia en 2 pacientes del grupo periodontitis, y en ningún paciente del grupo sano, aunque las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas ($p=0,148$). Las bacterias aisladas en estos casos fueron bacterias blanco-pigmentadas no hemolíticas,

no identificables como especies bacterianas relacionadas con enfermedades periodontales.

En los dos casos de bacteriemia post-cepillado interproximal coincidió la presencia de bacteriemia basal. En uno de ellos, además, el recuento bacteriano tras el procedimiento fue el doble que en basal, pasando de un recuento de 420 UFC/ml en basal a 1045 UFC/ml post-cepillado.

En la siguiente tabla podemos observar a modo de resumen los pacientes positivos tanto a bacteriemia basal y/o post procedimientos, con sus correspondientes recuentos de flora bacteriana a nivel de FCG:

	Grupo	R FCG	SANGRE BASAL		SANGRE POST	
			R total	R Perio	R total	R Perio
ID_4	P	$1,2 \times 10^7$	100	0	0	0
ID_5	P	$7,7 \times 10^5$	220	1 (Fn)	155	0
ID_7	P	$1,3 \times 10^7$	420	0	1045	0
ID_19	S	$2,1 \times 10^4$	650	0	0	0

Tabla 6. Pacientes con presencia de bacteriemia. (ID: identificación paciente; Fn: Fusobacterium nucleatum; P: periodontitis; R: recuento en unidades formadora de colonia por mililitro (UFC/ml); R FCG: recuento total de flora bacteriana en FCG; R total: recuento total; R Perio: recuento de especies bacterianas asociadas con enfermedades periodontales; S: sano).

VI. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de bacterias relacionadas con las enfermedades periodontales en bacteriemias de origen oral tras manipulaciones orales no profesionales, concretamente, tras procedimientos de higiene oral interproximal. También se analizó la flora bacteriana presente a nivel subgingival en pacientes con periodontitis crónica, comparando la misma con la de pacientes pertenecientes al grupo de sanos.

En nuestro estudio se observó que en los pacientes con periodontitis presentaban un mayor recuento total de bacterias anaerobias a nivel oral, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de pacientes periodontalmente sanos.

En cuanto al recuento individual de cada bacteria se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *T.forsythia* y *F.nucleatum*, siendo más abundantes en pacientes con periodontitis. Cabe destacar que la bacteria con un mayor recuento en los pacientes con periodontitis fue *Porphyromonas gingivalis* ($5,6973 \times 10^6$ UFC/ml), en comparación con los pacientes periodontalmente sanos ($5,0000 \times 10^3$ UFC/ml).

Respecto a la prevalencia de cada bacteria en los pacientes, que fue indicada como porcentaje de pacientes positivos a cada bacteria, se vio que *P.gingivalis*, *P.intermedia* y *T.forsythia* fueron las más prevalentes en el grupo con periodontitis crónica, siendo mucho menos prevalentes en los sujetos sanos.

En relación a las muestras de sangre, se observó que la prevalencia global de bacteriemia tras el cepillado interproximal fue de 9%, siendo estos 2 de los 22 pacientes analizados y concediendo estos con el grupo de periodontitis. Cabe mencionar que estos además también presentaron bacteriemia previa al cepillado interproximal, sin embargo en uno de ellos el recuento bacteriano tras el cepillado fue el doble que el recuento previo al cepillado interproximal. También se encontró presencia de una bacteria periodontopatógena (*F.nucleatum*) en un paciente del grupo de periodontitis en las muestras previas al cepillado, no coincidiendo este con una

bacteriemia tras el cepillado. Sin embargo, no fuimos capaces de identificar periodontopatógenos específicos como *P.gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en las muestras de sangre.

Las periodontitis crónicas son una de las enfermedades más frecuentes del ser humano a nivel oral; son consideradas infecciones crónicas dónde los patógenos bacterianos presentes en la placa subgingival son responsables del inicio y la progresión de la misma (Bascones et al. 20006). Las bacterias anaerobias más importantes y prevalentes en el área subgingival son *A.actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis*, pudiendo destacar también bacterias como *P.intermedia* y *T.forsythia*. En estudios recientes, se ha demostrado mediante el empleo de técnicas microbiológicas de cultivo (Sanz et al. 2000) que la frecuencia de detección en pacientes con periodontitis de *P. gingivalis* es especialmente elevada en España (superior al 60% de los pacientes con periodontitis). Así lo demuestran también los resultados encontrados en este estudio, ya que se pudo observar una mayor prevalencia y recuento individual de *P.gingivalis* en sujetos diagnosticados con periodontitis crónica.

En nuestro estudio se observó una prevalencia global de bacteriemia tras el cepillado interproximal del 9%. En comparación con los estudios publicados dónde analizan las bacteriemias tras actividades diarias rutinarias como los procedimientos de higiene bucodental, coincidimos con autores como Kinane et al. y Forner et al. (Kinane et al. 2005; Forner et al. 2006), dónde presentan prevalencias de bacteriemias post manipulaciones del 3% y 5% respectivamente. Sin embargo el grado de bacteriemia en nuestro caso fue de menor magnitud en comparación al 54%, 43%, 40% o 22% que presentaron autores como Madsen et al., Silver et al., Crasta et al. y Lockhart et al. respectivamente (Madsen et al. 1974; Silver et al. 1977; Crasta et al. 2009; Lockhart et al. 2008). Cabe destacar que en uno de los estudios publicado no encuentran bacteriemia tras procedimientos de higiene bucodental (Hartzell et al. 2005).

Si observamos y comparamos las prevalencias de bacteriemias tras procedimientos de higiene oral, en pacientes con periodontitis versus los pacientes periodontalmente sanos, en nuestro estudio pudimos concluir que el 9% corresponde únicamente a pacientes con periodontitis, siendo de 0% en pacientes periodontalmente sanos. Estos resultados coinciden con los presentados en el estudio de Kinane et al. (Kinane et al. 2005) dónde el 5% de bacteriemia observado corresponde únicamente a pacientes con periodontitis, no dando positivo a bacteriemia ningún paciente periodontalmente sano. Esto puede indicar por ello, que en condiciones inflamatorias como en casos de periodontitis crónica, puede que exista una mayor entrada de microorganismos al torrente sanguíneo, debiéndose al mayor grado de irrigación periodontal que presentan estos pacientes, produciendo así una mayor superficie de entrada para las bacterias (Parahitiyawa et al. 2009). No obstante, Madsen et al. (Madsen et al. 1974) observan un 54% de prevalencia en pacientes con periodontitis respecto a 19% en pacientes periodontalmente sanos. Estudios recientes citan que la prevalencia de bacteriemias estaría más asociada a la cantidad de placa bacteriana presente y al grado de inflamación gingival, que al diagnóstico periodontal (Tomás et al. 2012). Con ello se justificaría que, en estudios que consideran periodontalmente sanos pacientes con gingivitis pueden dar positivo a bacteriemias tras procedimientos de origen oral.

Esta amplia variabilidad encontrada entre diferentes estudios puede deberse en parte **al estímulo** utilizado para provocar dichas bacteriemias, si bien es verdad que todos analizan las bacteriemias tras procedimiento de higiene oral, el mecanismo utilizado para dicho fin no es el mismo. Algunos autores utilizan cepillos tradicionales manuales sin pasta dentífrica (Kinane et al. 2005; Lockhart et al. 2008) o con pasta (Hartzell et al. 2005; Schlein et al. 1991), o incluso cepillos eléctricos (Silver et al. 1977; Scoyers et al. 1973). Sin embargo dos de los estudios que presentan una mayor prevalencia de bacteriemias, son aquellos en los que se ha utilizado un procedimiento de higiene oral interproximal. En el caso de Crasta et al. (Crasta et al. 2009) utiliza el hilo dental, encontrando una prevalencia del 40%, así mismo Madsen et al. (Madsen et

al. 1974) complementa el cepillado dental cotidiano con el uso de palillos interproximales encontrando por ellos prevalencias del 54%. Esto puede indicar que el utilizar técnicas de higiene interproximal puede aumentar el grado de bacteriemia, a diferencia de estudios dónde evalúan el cepillado cotidiano. Esto puede deberse a que en el caso del hilo dental sobre todo, éste debe ser introducido bajo la encía, siendo este el lugar dónde se encuentran las bacterias, pudiendo así favorecer de una forma mayor al paso de bacterias al torrente sanguíneo. Sin embargo, en nuestro estudio fueron utilizados cepillos interproximales y los resultados no fueron tan prometedores. Cabe destacar que los autores que más prevalencia presentan, son aquellos en los que el procedimiento de higiene oral, fue realizado por parte del investigador (Crasta et al. 2009; Madsen et al. 1974; Silver et al. 1977) y no por parte del propio paciente como en algunos de los demás estudios (Kinane et al. 2005; Lockhart et al. 2008; Schlein et al. 1991). Esto puede influenciar en los resultados, ya que si el procedimiento de higiene oral es realizado por parte del investigador, implicara que este tenga la técnica más depurada y perfeccionada, siendo además el estímulo más estandarizado para todos los pacientes. En nuestro caso todos los procedimientos de higiene interproximal fueron realizados por un único investigador calibrado.

Por otro lado, si observamos ***el tiempo empleado para los procedimientos*** de higiene oral, podemos observar que en el estudio de (Hartzell et al. 2005), dónde muestran un 0% de prevalencia global tras la higiene oral, el tiempo del procedimiento fue menor de 1 minuto, pudiendo ser por ello tiempo insuficiente para provocar bacteriemia. En los demás estudios que dan positivo a bacteriemias de origen oral, los tiempo del procedimiento de higiene oral fueron de 2 minutos (Kinane et al. 2005, Silver et al.; Lockhart et al. 2008; Schlein et al. 1991), incluso existiendo un estudio en el que la duración fue de 4 minutos. Sin embargo, el hecho de aumentar el tiempo de la técnica de higiene oral, no suponía una mayor prevalencia. Cabe destacar, que en el estudio de Hartzell et al. (Hartzell et al. 2005) complementan el cepillado dental con el uso de una pasta dentífrica, siendo el único autor que lo hace y pudiendo por ello influir en los resultados. En nuestro caso, el tiempo utilizado para el paso de

cepillos interproximales fue de máximo 2 minutos, coincidiendo con algunos de los autores. Aún así, quizás no fue suficiente el tiempo empleado para el estímulo de bacteriemia.

Las diferencias encontradas en los resultados de los estudios publicados, también puede deberse al ***momento de la toma de sangre*** tras el procedimiento de higiene oral. Observamos que autores como Kinane et al. (Kinane et al. 2005), que toman una única muestra de sangre inmediatamente después del cepillado dental, presenta una menor prevalencia (3%), en comparación a aquellos que esperan un mínimo de 30 segundos (19%, 41%) (Silver et al. 1977; Lucas et al. 2008), un 1 minuto (17%, 54%) (Madsen et al. 1974; Sconyers et al. 1973) o incluso 3 minutos (25%) (Schlein et al. 1991). Sin embargo, en aquellos autores que evalúan la bacteriemia de una forma escalonada en el tiempo como en el caso de Crasta et al. (Crasta et al. 2009), se observa que a los 30 segundos tras el procedimiento de higiene oral la prevalencia es del 40% en pacientes con periodontitis, pero a los 10 min aún encontrado cierto grado de prevalencia, está es mucho menor (27%). En el estudio de Lockhart et al. (Lockhart et al. 2008) obtienen muestras de sangre durante el procedimiento de higiene oral, a los 3 minutos, a los 20 y 40 minutos tras el procedimiento, observando que de la prevalencia global presentada de 22% en todas las tomas, el 93% correspondían a muestras tomadas a 1,5 minutos tras el inicio del procedimiento y viendo sólo un 9% a los 20 minutos. En nuestro caso el momento de la toma de sangre se realizó 1 minuto tras finalizar del paso de cepillos interproximales; sin embargo en comparación con los autores que también usan este momento de toma, en nuestro caso observamos que el grado de bacteriemia es menor.

Otros de los motivos que puede dar lugar a la gran diversidad de resultados en los estudios, se deba a la ***técnica de análisis utilizada***. Algunos autores utilizan sistemas de hemocultivo (Hartzell et al. 2005; Silver et al. 1977; Schlein et al. 1991),

utilizando algunos de ellos uno más específicos como el BACTEC (Kinane et al. 2005; Lockhart et al. 2008); mientras que otros por el contrario utilizan sistemas de lisis centrifugación (Lucas et al. 2008; Forner et al. 2006), con mayores valores de prevalencia (40%, 43%) (Crasta et al. 2009; Silver et al. 1977] con BACTEC que con lisis centrifugación (19% y 5%) (Forner et al. 2006; Lucas et al. 2008). Cabe destacar que estos dos sistemas son utilizados en el ámbito hospitalario para detectar e identificar bacterias de una forma más general, no siendo específicos para bacterias periodontales. En nuestro caso se aplicó una técnica consolidada y muy utilizada para la detección de bacterias periodontopatógenas presentes en muestras de FCG (Oteo et al. 2010; Herrera et al. 2008). Con ello, se vio que el empleo de esta técnica de cultivo directa y específica de bacterias periodontales, es capaz de detectar cierto grado de bacteriemia de origen oral, siendo en nuestro caso de un 9%.

Cabe destacar que autores como Lockhart et al. y Kinane et al. (Kinane et al. 2005; Lockhart et al. 2008) complementan el sistema del hemocultivo con una técnica de biología molecular de PCR basada en el uso de cebadores bacterianos universales para el gen 16S ARN. En el caso de Kinane et al. (Kinane et al. 2005), se observó que la prevalencia del 3% de bacteriemia observada en los pacientes con técnicas de hemocultivo, fue mayor al analizarla con PCR, aumentándose hasta un 13% la prevalencia.

Aunque para la evaluación directa de los patógenos periodontales en sangre periférica, las técnicas de cultivo hayan sido las más utilizadas, existen autores Castillo et al. (Castillo et al. 2011) que afirman, que este tipo de técnicas al requerir el uso de medios enriquecidos, podría hacer poco fiable su sensibilidad, pudiendo así detectar una cantidad menor de bacterias que las presentes en la realidad. Por ello, proponen que métodos diagnósticos basados en técnicas de biología molecular pudieran aumentar la sensibilidad y la especificidad de la detección de microorganismos, incluyendo la detección de organismos muertos que puedan estar presentes en el

torrente sanguíneo y que no podrían ser identificados por técnicas de cultivo, ya que estas se basan en el crecimiento y proliferación bacterianos.

Además existen estudios, que han utilizado este tipo de técnicas de biología molecular de la PCR, con cebadores específicos para bacterias periodontopatógenas para analizar las bacteriemias tras procedimientos clínicos como el raspado y alisado radicular, obteniendo resultados positivos de prevalencia ante patógenos periodontales como *P.gingivalis* y *A.actinomyetemcomitans* dónde se observó un 31% y 21,4 % de prevalencia respectivamente (Castillo et al. 2011).

Esto podría justificar, que en nuestro estudio, puede que aún no encontrando resultados positivos para dichas bacterias utilizando medios de cultivo directos, podrían ser detectados mediante técnicas de biología molecular, ya que estos son capaces de identificar cantidades más pequeñas de bacterias e incluso bacterias que al pasar al torrente sanguíneo podrían presentarse muertas.

Por otro lado, en cuanto al **tipo de bacterias** encontradas en sangre, tanto en muestras previas y posteriores al cepillado interproximal, pudimos identificar las bacterias con una morfología blanco pigmentadas no hemolíticas, sólo siendo capaces de identificar una especie bacteriana relacionada con la periodontitis en uno de los pacientes del grupo de periodontitis (*F. nucleatum*). Sin embargo, autores como Lockhart et al. y Crasta et al. (Crasta et al. 2009; Lockhart et al. 2008) sí encontraron presencia de *A. actinomyetemcomitans* en muestras de sangre tras procedimientos de higiene oral. No obstante, en la mayoría de los estudios publicados el género bacteriano más identificado es el *Streptococcus spp.* Por ejemplo en el trabajo publicado por Lockhart et al. (Lockhart et al. 2008) destacan que el 49% de toda la flora bacteriana encontrada fueron *Streptococcus spp.* Además autores como Forner et al. y Crasta et al. (Forner et. 2006; Crasta et al. 2009), junto con Lockhart et al. (Lockhart et al. 2008), encuentran especies como *Streptococcus mitis* o *Streptococcus mutans*, siendo éstas colonizadores de la flora oral.

Por ello, tanto el no haber podido identificar correctamente la especie encontrada en las bacteriemias (colonias blancas beta hemolíticas o no-hemolíticas), como el hecho de ser un estudio piloto con un número reducido de participantes, determina que nuestros resultados tienen que ser interpretados y comparados con los otros estudios con precaución. Sin embargo, los datos de este estudio resultan idóneos para ser usados como la base para el diseño de futuros estudios que traten de determinar el grado y la magnitud de bacteriemias tras procedimientos de higiene oral interproximal. Por ello en futuros estudios sería recomendable: (1) mantener el mismo estímulo para provocar la bacteriemia pero aumentando el tiempo del mismo; (2) utilizar técnicas de biología molecular, para así poder complementar a las técnicas de cultivo, y comparar con ello la capacidad de detección de bacterias periodontales no sólo en bacteriemias sino también en las muestras de fluido cervical; por último (3) respecto al momento de la toma de muestras de sangre tras los procedimientos de higiene oral, se podría valorar el tomar las muestras a los 30 segundos y no 1 minuto después.

VII. CONCLUSIONES

Considerando las limitaciones del presente estudio piloto, se puede concluir lo siguiente:

1. Existe riesgo de sufrir bacteriemias repetidas tras el uso de cepillos a nivel interproximal; sin embargo, no se pueden establecer conclusiones sobre la influencia del diagnóstico periodontal en este riesgo, dado que es un estudio piloto con un número reducido de pacientes.
2. Aunque las técnicas microbiológicas de cultivo específicas utilizadas para el diagnóstico de bacterias de muestras de FCG puede ser utilizadas para analizar cierto grado de bacteriemias de origen oral, técnicas con más sensibilidad y especificidad como la PCR podrían ayudar a una mayor detección de las mismas.
3. Los sujetos que presentaron bacteriemia de origen basal, pueden indicar una exposición acumulativa de bacterias en el torrente sanguíneo tras la realización de actividades diarias rutinarias como el cepillado o la masticación en pacientes con periodontitis.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AAP. Consensus Report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996; 1: 926-32.
- Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Microbiol 2001; 39(2):509-13.
- Anil S, Al-Ghamdi H. The impact of periodontal infections on systemic diseases. An update for medical practitioners. Saudi Med J 2006;27 (6):767-76.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999;4(1):1–6.
- Claesson R, Lagervall M, Höglund-Aberg C, Johansson A, Haubek D. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden. J Clin Periodontol 2011;38(2):115-21.
- Bascones-Martínez A, Arias-Herrera S, Criado-Cámara E, Bascones-Ilundáin J, Bascones-Ilundáin C. Periodontal disease and diabetes. Adv Exp Med Biol 2012;771:76-87.
- Bascones-Martinez A, Figuero Ruiz E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Av Periodon Implantol 2006;17: 147-68.
- Beck JD, Slade G, Offenbacher S. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. Periodontol 2000 2000;23:110-20.
- Bouchard P, Boutouyrie P, D'Aiuto F, Deanfield J, Deliargyris E, Francisco Fernandez-Aviles F, et al. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease consensus document. Eur Heart J 2010; 12: B13–B22.
- Brodala N, Merricks EP, Bellinger DA, Damrongsri D, Offenbacher S, Beck J, et al. *Porphyromonas gingivalis* bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25(7):1446-51.

- Carmona IT, Diz DP, Scully C. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;93:660-70.
- Castillo DM, Sánchez-Beltrán MC, Castellanos JE, Sanz I, Mayorga-Fayad I, Sanz M, et al. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol* 2011;38(5):418-27.
- Castro Lara J, Ibero Sagastibelza I, Bascones-Martinez A. ¿Es la enfermedad periodontal un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares? (1). Etiopatogenia y ensayos clínicos. *Av Periodon Implantol* 2001;13:65-75.
- Chapple IL, Genco R. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 2013;84(4 Suppl):S106-12.
- Chun YH, Chun KR, Olguin D, Wang HL. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *J Periodontal Res* 2005;40(1):87-95.
- Claesson R, Lagervall M, Höglund-Aberg C, Johansson A, Haubek D. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden. *J Clin Periodontol* 2011;38(2):115-21
- Crasta K, Daly CG, Mitchell D, Curtis B, Stewart D, Heitz-Mayfield LJ. Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol* 2009; 36(4):323-32.
- Daly CG, Mitchell DH, Highfield JE, Grossberg DE, Stewart D. Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *J Periodontol* 2001;72(2):210-4.
- ENSE. Encuesta de Salud Nacional España. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad. Portal estadístico del SNS. <
<http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2011.htm>>

- Figuero E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2011; 82(10):1469-77.
- Fine DH, Furgang D, McKiernan M, Tereski-Bischio D, Ricci-Nittel D, Zhang P, et al. An investigation of the effect of an essential oil mouthrinse on induced bacteraemia: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2010;37(9):840-7.
- Ford PJ, Gemmell E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, Bird PS et al. Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21(4):206-11.
- Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. 2006;33(6):401-7.
- Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol* 2009;80(7):1021-32.
- Gaetti-Jardim E Jr, Marcelino SL, Feitosa AC, Romito GA, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol* 2009;58(12):1568-75.
- Guntheroth WG. How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis?. *Am J Cardiol* 1984;54(7):797-801.
- Hartzell JD, Torres D, Kim P, Wortmann G. Incidence of bacteremia after routine tooth brushing. *Am J Med Sci* 2005;329(4):178-80.
- Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008; 371(9608):237-42.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol* 2000 2010; 4(1):78-105.

- Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. J Clin Periodontol 2008;35(2):106-13
- Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternalperiodontal disease and adverse pregnancy outcomes - systematic review. J Periodontol 2013;84(4 Suppl):S181-94.
- Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, MacKenzie D, Shearer B. Bacteraemia following periodontal procedures. J Clin Periodontol 2005;32(7):708-13.
- León R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M, et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. J Periodontol 2007;78:1249-55.
- Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. Circulation 2008;117(24):3118-25.
- Lucas VS, Gafan G, Dewhurst S, Roberts GJ. Prevalence, intensity and nature of bacteraemia after toothbrushing. J Dent 2008;36(7):481-7.
- Loza Fernández E, Planes A, Rodríguez M. Hemocultivos en Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003, Editores: E. Cercenado y R. Cantón.
- Madsen KL. Effect of chlorhexidine mouthrinse and periodontal treatment upon bacteremia produced by oral hygiene procedures. Scand J Dent Res 1974;82(1):1-7.
- Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. BMJ.1989;298(6676):779-81.
- Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. J Periodontal Res 1991;26(4):308-13.

- Morozumi T, Kubota T, Abe D, Shimizu T, Komatsu Y, Yoshie H. Effects of irrigation with an antiseptic and oral administration of azithromycin on bacteremia caused by scaling and root planing. *J Periodontol* 2010;81(11):1555-63.
- Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K et al. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(1):64-8.
- Offenbacher S, Williams RC, Champagne C. In Dental plaque revisited. Oral biofilms in health and disease. eds. Newman HN, Wilson M. Cardiff;1996. p. 375-385.
- Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M. Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis*-associated periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2010;37(11):1005-15.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 2000 1997; 14: 216–48.
- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997;14: 9–11.
- Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol* 2000 2010; 52(1):218-37.
- Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam WC, Samaranayake P. Microbiology of odontogenic bacteraemia: beyond endocarditis. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 22: 46-64.
- Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldán S, Progulske-Fox A. Periodontal bacterial invasión and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Periodontol* 2013; 84: 30-50.
- Roberts GJ. Dentists are innocent! "Everyday" bacteremia is the real culprit: a review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatr Cardiol.* 1999;20(5):317-25.

- Sanz M, D'Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease—scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *Eur Heart J* 2010; 12 (Supp B):B3-B12.
- Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellemijn-Kippuw N, Simón R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108: 383-392.
- Sanz M, Kornman K. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 2013;84(4 Suppl):S164-9.
- Schlein RA, Kudlick EM, Reindorf CA, Gregory J, Royal GC. Toothbrushing and transient bacteremia in patients undergoing orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99(5):466-72.
- Sconyers JR, Crawford JJ, Moriarty JD. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. *J Am Dent Assoc* 1973;87(3):616-22.
- Silver JG, Martin AW, McBride BC. Experimental transient bacteraemias in human subjects with varying degrees of plaque accumulation and gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 1977;4(2):92-9.
- Tonetti M, Van Dyke TE. "Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/ AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 2013; 84(4 Suppl):S24-9
- Tomás I, Diz P, Tobías A, Scully C, Donos N. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2012;39(3):213-28.
- Tonetti M, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 2007;356(9):911-20.
- Zaremba M, Górska R, Suwalski P, Kowalski J. Evaluation of the incidence of periodontitis-associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol* 2007;78(2):322-7.

ANEXO I: Hoja de información para el paciente

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Odontología

HOJA DE INFORMACIÓN

Estudio: *Detección y cuantificación de bacteriemias asociadas a manipulaciones bucales no profesionales.*

Investigadores: MARIANO SANZ, DAVID HERRERA, ELENA FIGUERO, ESTEFANÍA LAGUNA, M^aJOSÉ MARÍN, MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ, ARANCHA LLAMA

Centro de la Investigación

Estudio Clínico: Clínica del Programa Máster de Periodoncia
Facultad de Odontología
Universidad Complutense – Madrid

Estudio Microbiológico: Servicio de Microbiología Oral y Biología Molecular
Facultad de Odontología
Universidad Complutense – Madrid.

INFORMACIÓN

Las periodontitis son un grupo de enfermedades de naturaleza infecciosa, caracterizadas por la destrucción del aparato de soporte del diente (periodonto). La principal consecuencia de las periodontitis, la pérdida de dientes, causa dificultades funcionales y estéticas; sin embargo, en los últimos años también se han asociado a problemas de salud sistémico.

El factor etiológico primario en las periodontitis es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de biofilm bajo la encía (subgingival). En España, *Porphyromonas gingivalis* es el patógeno más frecuentemente asociado a periodontitis. Esto hace que, junto con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que es una de las bacterias con mayor capacidad patogénica, cobren una relevancia fundamental en el estudio de las periodontitis.

Debido a las características de las lesiones periodontales, las bacterias presentes en el biofilm subgingival, incluidos los patógenos mencionados, pueden pasar a la circulación sanguínea sistémica (bacteriemia).

En pacientes con periodontitis, existe un riesgo aumentado de sufrir bacteriemias repetidas, espontáneamente o tras maniobras habituales en la vida diaria, como el cepillado dental, masticar o tragar, etc. El paso de estas bacterias a sangre puede ser el posible nexo de unión que explique la asociación encontrada entre pacientes con periodontitis y determinadas enfermedades sistémicas, tales como enfermedades cardiovasculares.

Se le pedirá que acuda a dos visitas. El estudio consistirá en el registro de medidas clínicas y microbiológicas, en la administración de medidas de higiene oral (uso de cepillos interproximales) y en la toma de muestras de sangre inmediatamente antes y un minuto después.

Seme ha explicado que para la realización del tratamiento es imprescindible mi colaboración con unas medidas de higiene y alimentación previas a la cita de toma de muestras, siendo así que su omisión puede provocar resultados distintos a los esperados. A su vez, asumo que no debo de tomar ningún antibiótico ni antiséptico que pueda influir en los resultados del estudio, a no ser que sea estrictamente necesario y prescrito por un facultativo.

Cualquier duda que tenga, podrá ser resuelta por cualquiera de los miembros del equipo investigador.

ANEXO II: Consentimiento Informado

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Odontología

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio: *Detección y cuantificación de bacteriemias asociadas a manipulaciones bucales no profesionales.*

Yo.....
(NOMBRE Y APELLIDOS)

He recibido la hoja de información.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido respuesta satisfactoria a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con
(NOMBRE Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio.

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

....., de de 20.....

Firma del Participante

.....